



TITLE:

低レイノルズ数における流体力学的同期現象：ミニマルアプローチ (生物流体力学及び関連する問題の研究)

AUTHOR(S):

内田, 就也

CITATION:

内田, 就也. 低レイノルズ数における流体力学的同期現象：ミニマルアプローチ (生物流体力学及び関連する問題の研究). 数理解析研究所講究録 2012, 1808: 78-87

ISSUE DATE:

2012-09

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/194445>

RIGHT:

低レイノルズ数における流体力学的同期現象： ミニマルアプローチ

内田 就也（東北大学 大学院理学研究科 物理学専攻）

Nariya Uchida (Department of Physics, Tohoku University)

1 序論

大腸菌 (*E. coli*) やゾウリムシ (*Paramecium*) のような水中に棲息する単細胞生物の遊泳は、生物流体力学における興味深い問題の一つである。これらの微生物の遊泳は、水の慣性が効かない低レイノルズ数領域で行われるという点において、大型生物の遊泳と根本的に異なる。慣性を無視した流体力学方程式の時間反転に対する対称性から、蝶番で固定された翼の開閉のような単純往復運動では（長時間平均の意味において）推進できないことが導かれる（帆立貝定理 [1]）。そのため微生物は運動器官の回転的な（時間反転対称性を破る）運動を利用して遊泳する。さらに、複数の運動器官の同期または集団運動を利用して推進を制御している。例えば大腸菌は数本のらせん状のバクテリア鞭毛を持ち、それらを船のスクリューのように回転させて推進する。これらの鞭毛は回転の向きに応じて、束になって一方向に推進力を生み出すモード（swimming mode）とばらばらの方向を向いて推進力をバランスさせ一か所にとどまるモード（tumbling mode）を取ることができる [2]。またゾウリムシが持つ繊毛は、速く大きく水をかく有効打と、細胞表面近くを這うようにゆっくり戻る回復打を繰り返すことで推進する。ゾウリムシの細胞表面は数千本の繊毛で覆われており、それらは自発的に進行波パターン（メタクロナル波）を形成して細胞表面に沿った流れを作り出す [2]。真核生物の鞭毛は、繊毛と同じ構造を持つ。最近、クラミドモナスが持つ鞭毛の水かき運動が詳細に観察され、2本の鞭毛が同期した状態と同期していない状態をくり返していることが判明した [3]。これらの運動器官の集団運動においては流体力学相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。

流体力学相互作用が2本の真核生物鞭毛の波打ちを同期させるというアイデアは、古く 1950 年代に G. I. Taylor によって示された [4]。近年、鞭毛や繊毛の運動のモデルが多数提案され、数値シミュレーションを援用して流体力学相互作用による同期現象が調べ

られている [5, 6, 7, 8]. しかしそれらのモデルの多くは複雑かつ個別的であり, 何が同期を引き起こす本質的な要素であるかという問いには十分答えていない. そこで, 鞭毛や繊毛の最小限の力学的特徴を抽出したミニマルモデルによる解析的なアプローチが求められる. 考えられる最も単純なモデルは, 鞭毛や繊毛を, 一定のトルクを受けて固定軸の周りを回転する剛体らせん [9] や固定軌道上を運動する剛体球 [10] で置き換えたモデルであるが, これらは同期を示さないことが分かっている. そこでこれらの剛体にバネを取り付けて運動に柔軟性を与えたところ, 同期することが示された [11, 12]. このことから, 鞭毛や繊毛が持つ柔軟性が, それらの同期現象にとって必須であるという主張がなされてきた.

しかし我々は最近, 柔軟要素を持たないモデルによっても流体力学的同期現象が説明できることを示した. その 1 つは, 繊毛の有効打と回復打のように周期的に変動する駆動力を受けて固定軌道上を運動する剛体球のモデルである [13]. もう一つは, バクテリアの鞭毛が作り出す軸方向の水流を, 流体に対する一定の駆動力で置き換えた剛体モデルである [14]. 講演では両方のモデルを紹介したが, 本稿では前者に限定して解説することとする. 後者のモデルについては過去の講究録記事 [15] を, また従来の研究についてはレビュー [16] を参照されたい.

2 モデル

繊毛の重心運動の自由度だけを取り出し, これを非圧縮性流体中の 1 個の剛体球の運動に置き換えたモデルを考える. 剛体球は平面基盤から伸びる細い支持腕から駆動力を受けて一定の軌道上を回転するものとしよう. 軌道の形状は, 軌道上に適当に定義された位相 ϕ の関数 $\mathbf{R}(\phi)$ で与えられるとする (図 1 (a) 参照). 平面基盤上に xy 座標, 基盤に垂直な方向に z 軸を取る. 繊毛の有効打と回復打の特徴を一般化して, 剛体球は周期的に変動する任意の駆動力 $F(\phi)$ を軌道接線方向に受けるとする (法線方向の駆動力は軌道への拘束の条件から自動的に決定される). なお軌道の単位接ベクトルは $\mathbf{t}(\phi) = \mathbf{R}'(\phi)/|\mathbf{R}'(\phi)|$ (以下 $' = \frac{d}{d\phi}$) である.

いまこの回転子を複数個, 一定の間隔 d , 基盤からの高さ h で一列に配置した系を考える. 第 i 番目の回転子の位相を ϕ_i , 剛体球の位置を $\mathbf{r}_i = id\mathbf{e}_x + h\mathbf{e}_z + \mathbf{R}(\phi_i)$ ($\mathbf{e}_x, \mathbf{e}_z$ はそれぞれ x 軸, z 軸方向の単位ベクトル) とする. 剛体球の速度は $\mathbf{V}_i = \dot{\phi}_i \mathbf{R}'(\phi_i)$ (以下

$\dot{\phi}_i = \frac{d}{dt}$) であり, 流体から受ける抵抗力は, 流速場を $\mathbf{v}(\mathbf{r})$ として $\mathbf{g}_i = \zeta[\mathbf{v}(\mathbf{r}_i) - \mathbf{V}_i]$ の形に与えられる. ここで ζ は抵抗係数であり, 流体の粘性率を η , 剛体球の半径を a として $\zeta = 6\pi\eta a$ である (基盤からの高さ R_z による $O(a/R_z)$ の補正はここでは無視する). 抵抗力の接線成分と駆動力のつりあいの式 $\mathbf{g}_i \cdot \mathbf{t}(\phi_i) + F(\phi_i) = 0$ から, 位相速度は

$$\dot{\phi}_i = \omega(\phi_i) + \mathbf{v}(\mathbf{r}_i) \cdot \frac{\mathbf{t}(\phi_i)}{|\mathbf{R}'(\phi_i)|}, \quad \omega(\phi) = \frac{F(\phi)}{\zeta|\mathbf{R}'(\phi)|}. \quad (1)$$

と得られる. ここで $\omega(\phi)$ は外流がない場合の固有位相速度である. 各回転子が流体に与える力は $-\mathbf{g}_i$ であるから, 回転子が作る流速場は, $\mathbf{v}(\mathbf{r}) = -\sum_i \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_i) \cdot \mathbf{g}_i$ となる. ここで $\mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_i)$ は平面基盤での滑りなし境界条件を満たす Stokes 方程式の Green 関数 (Blake テンソル) であり, 基盤近傍では次の近似形を持つ.

$$\mathbf{G}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \simeq \frac{3z_1 z_2}{2\pi\eta|\mathbf{r}_{12}^\perp|^5} \mathbf{r}_{12}^\perp \mathbf{r}_{12}^\perp, \quad z_1, z_2 \ll r_{12}^\perp, \quad \mathbf{r}_{12}^\perp = (x_1 - x_2, y_1 - y_2, 0). \quad (2)$$

これを無次元化した $\hat{\mathbf{G}}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \zeta \mathbf{G}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ は $O(ah^2/d^3)$ の微小量であり, 回転子が作る流速場は $\hat{\mathbf{G}}$ の 1 次までで

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) \simeq \sum_i \hat{\mathbf{G}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \cdot \mathbf{R}'(\phi_i) \omega(\phi_i) \quad (3)$$

と書ける. これを (1) に代入して, 位相の時間発展方程式を

$$\dot{\phi}_i = \omega(\phi_i) \left(1 + \sum_{j \neq i} \frac{F(\phi_j)}{F(\phi_i)} H_{ij}(\phi_i, \phi_j) \right), \quad (4)$$

$$H_{ij}(\phi_i, \phi_j) = \mathbf{t}(\phi_i) \cdot \hat{\mathbf{G}}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) \cdot \mathbf{t}(\phi_j) \quad (5)$$

の形に得る. ここで $H_{ij}(\phi_i, \phi_j)$ は軌道の形状と配置のみによって決まる因子であり, 以下では軌道因子と呼ぶことにする.

3 線形安定性解析 (2 体系)

時間発展方程式 (4) を用いて, まず 2 個の回転子が同期するための条件を求めよう.

$\phi_1 = \phi + \delta, \phi_2 = \phi$ とおくと, 位相差 $\delta = \phi_1 - \phi_2$ の時間発展方程式は

$$\dot{\delta} = \omega(\phi + \delta) - \omega(\phi) + \left[\frac{F(\phi)}{F(\phi + \delta)} \omega(\phi + \delta) - \frac{F(\phi + \delta)}{F(\phi)} \omega(\phi) \right] H_{12}(\phi + \delta, \phi) \quad (6)$$

$$\simeq \left[\omega'(\phi) + \left(\omega'(\phi) - 2 \frac{F'(\phi)}{F(\phi)} \omega(\phi) \right) H_{12}(\phi, \phi) \right] \delta \quad (7)$$

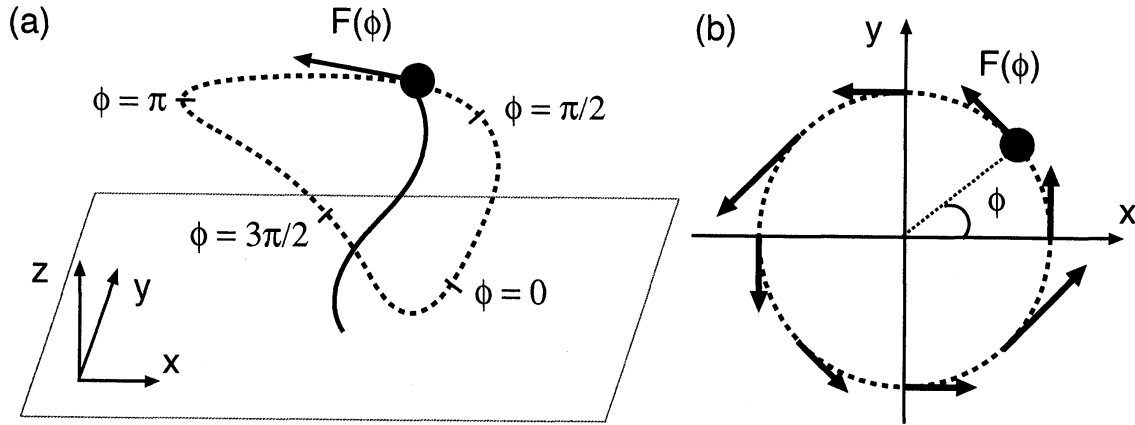


図 1: (a) 回転子モデルの模式図. 剛体球は接線方向の駆動力 $F(\phi)$ を受けて固定軌道上を運動する. (b) 同期を引き起こす軌道形状, 駆動力の例 (式 (9), (12)). x 軸上に配列した 2 個の回転子が同期する.

と δ について線形化できる. 位相差の線形成長率 δ/δ を周期 $T = \int_0^{2\pi} d\phi/\dot{\phi}$ にわたって時間平均したものは, \hat{G} の 1 次までの近似で

$$\Gamma = -\frac{2}{T} \int_0^{2\pi} d\phi [\ln F(\phi)]' H_{12}(\phi, \phi) \quad (8)$$

となる. 同相同期状態 ($\delta = 0$) が安定となるためには, 成長率 Γ が負となることが必要十分である. 式 (8) からただちに, 駆動力が一定であれば $\Gamma = 0$, すなわち同期状態は安定にならないことが分かる. また軌道因子 $H_{12}(\phi, \phi)$ が一定値を取る場合も $\Gamma = 0$ となってしまう. 逆に軌道因子が一定でなければ $\Gamma < 0$ となるような駆動力プロファイル $F(\phi)$ を構成することが必ずできる. 例えば $[\ln F(\phi)]' = cH_{12}(\phi, \phi)$ (c は正の定数) を満たすように $F(\phi)$ を決めればよい. このように, 同期状態は極めて一般的な条件の下で安定化するといえる.

例として, 平面基盤に平行な半径 b の円軌道

$$\mathbf{R}(\phi) = (b \cos \phi, b \sin \phi, 0) \quad (9)$$

を考えよう. 軌道因子は無次元結合定数

$$\gamma = \frac{9ah^2}{d^3} \quad (10)$$

を用いて

$$H_{12}(\phi, \phi) = \gamma \sin^2 \phi = -\frac{\gamma}{2} \cos 2\phi + \text{const} \quad (11)$$

となる。これに対して成長率 (8) を負にするためには、 $\ln F(\phi)$ の Fourier 級数展開において $\sin 2\phi$ が負の係数を持つことが必要十分である。これを満たすには例えば

$$F(\phi) = F_0(1 - A \sin 2\phi), \quad F_0 > 0, \quad 0 < A < 1 \quad (12)$$

のように $F(\phi)$ 自体が倍調波成分を含んでいてもよいし、

$$F(\phi) = F_0[1 + B \sin(\phi + \alpha)], \quad F_0 > 0, \quad |B| < 1, \quad 0 < \alpha < \frac{\pi}{2} \quad (13)$$

のように基本周波成分だけを含んでいてもよい。式 (12) の駆動力プロファイルを図 1(b) に示す。

次に線形軌道 $\mathbf{R}(\phi) = bt_0 \sin \phi$ を考えよう。ここで t_0 は軌道の向きを表す単位ベクトルである。このとき軌道因子は

$$H_{12}(\phi, \phi) = \gamma(t_0 \cdot \mathbf{e}_x)^2 = \text{const} \quad (14)$$

となるため、同期状態は安定化しないことが分かる。しかし平行でない線形軌道については、同期状態を導くような駆動力プロファイルを構成することができる [13]。

4 非線形安定性解析 (2 体系)

同相同期 ($\delta = 0$) 以外の安定状態を探すためには任意の δ に対する時間発展方程式 (6) を用いる必要がある。これは δ と ϕ の 2 つの変数を含むが、次に述べる処方により 1 変数の方程式に縮約することができる。いま位相は軌道を 1 周する間に 2π 増加するような任意のパラメータであるが、この任意性を利用して、固有位相速度 $\omega(\phi)$ が定数となるように位相 ϕ を再定義する：

$$\omega(\phi) = \frac{2\pi}{T} = \text{const} \quad (15)$$

この位相 (以下では定速ゲージとよぶ) は、任意の位相 $\tilde{\phi}$ からゲージ変換 $d\phi/d\tilde{\phi} = 2\pi/T\tilde{\omega}(\tilde{\phi})$ によって得られる。ここで $\tilde{\omega}(\tilde{\phi}) = \tilde{F}(\tilde{\phi})/\zeta|d\tilde{\mathbf{R}}/d\tilde{\phi}|$ はゲージ $\tilde{\phi}$ における固有位相速度であり、駆動力 $\tilde{F}(\tilde{\phi}) = F(\phi)$ および軌道形状 $\tilde{\mathbf{R}}(\tilde{\phi}) = \mathbf{R}(\phi)$ により与えられる。

定速ゲージを用いると時間発展方程式 (6) の右辺第 1,2 項は相殺し、相互作用項のみが残る：

$$\dot{\delta} = \left[\frac{F(\phi)}{F(\phi + \delta)} \omega(\phi + \delta) - \frac{F(\phi + \delta)}{F(\phi)} \omega(\phi) \right] H_{12}(\phi + \delta, \phi). \quad (16)$$

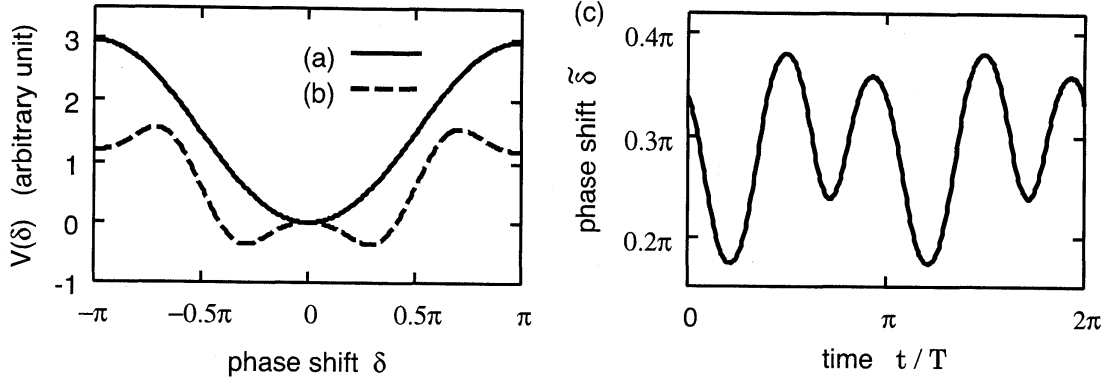


図 2: 有効ポテンシャル $V(\delta)$ の例. (a) 円軌道 (9), 駆動力 (12) の場合. (b) 楕円軌道 (18), 駆動力 (19) の場合. (c) ポテンシャル (b) の安定状態の 1 つ $\delta = \delta_0 \simeq 0.29\pi$ における自然ゲージでの位相差 $\tilde{\delta}$ の振動.

いま相互作用は弱い ($H_{12}(\phi, \phi) = O(\gamma) \ll 1$) としているので, 位相差 δ の時間変化は ϕ に比べて遅い. そこで ϕ が 2π 増える間に右边に含まれる δ は変化しないと近似して, 上式を 1 周期にわたって時間平均する.

$$\begin{aligned} \dot{\delta} &= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\phi \left[\frac{F(\phi)}{F(\phi+\delta)} \omega(\phi+\delta) - \frac{F(\phi+\delta)}{F(\phi)} \omega(\phi) \right] H_{12}(\phi+\delta, \phi) \\ &= -V'(\delta) \end{aligned} \quad (17)$$

こうして右边は δ のみの関数となり, ダイナミクスは上式で定義される有効ポテンシャル $V(\delta)$ により記述される. なお上述の近似は相互作用の 1 次までで正しい近似であることが示せる.

例として, 円軌道 (9) (ただし $b \ll d$ の場合) と駆動力 (12) の組み合わせに対する有効ポテンシャルを図 2(a) に示す. より複雑な例として, 楕円軌道

$$\tilde{\mathbf{R}}(\tilde{\phi}) = b \left(\cos \tilde{\phi}, \frac{1}{2} \sin \tilde{\phi}, 0 \right), \quad b \ll d \quad (18)$$

と駆動力

$$\tilde{F}(\tilde{\phi}) = F_0 \left(1 - \frac{1}{10} \sin 2\tilde{\phi} + \frac{1}{2} \sin 4\tilde{\phi} \right), \quad (19)$$

の組み合わせに対する有効ポテンシャルを図 2(b) に示す. 逆相同期 ($\delta = \pi$) が準安定状態, $\delta = \pm\delta_0$, $\delta_0 \simeq 0.29\pi$ が安定状態となることが分かる. ここで式 (18, 19) は軌道ベクトルが x 軸となす角度を $\tilde{\phi}$ とする自然ゲージで記述していることに注意する. 安定状態 $\delta = \delta_0$ において, 自然ゲージにおける位相差 $\tilde{\delta} = \tilde{\phi}_1 - \tilde{\phi}_2$ は一定ではなく, 周期的に振動する. その様子を図 2(c) に示す.

5 進行波解 (多体系)

前節で導入した定速ゲージの応用として、最後に、回転子の1次元格子における進行波解について述べる。多体系においては、相互作用による位相のずれ

$$\Phi_i = \phi_i - \omega_0 t, \quad \omega_0 = \frac{2\pi}{T} \quad (20)$$

を遅い変数として用いるのが適当である。その時間発展方程式は (4) より

$$\begin{aligned} \dot{\Phi}_i &= \omega_0 \sum_{j \neq i} \frac{F(\Phi_j + \omega_0 t)}{F(\Phi_i + \omega_0 t)} H_{ij}(\Phi_i + \omega_0 t, \Phi_j + \omega_0 t) \\ &\simeq \frac{1}{T} \sum_{j \neq i} \int_0^{2\pi} d\psi \frac{F(\Phi_j + \psi)}{F(\Phi_i + \psi)} H_{ij}(\Phi_i + \psi, \Phi_j + \psi), \end{aligned} \quad (21)$$

となる。ここで $\psi = \omega_0 t$ について周期平均を取り、 \hat{G} について1次までで正しい近似を行った。式 (21) 右辺の積分は位相の一斉シフト $\Phi_i \rightarrow \Phi_i + \alpha$ に対して不変であるので、 $\Phi_i - \Phi_j$ (および流体相互作用カーネルに含まれる $\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$) の関数となる。それを $J_{ij}(\Phi_i - \Phi_j)$ と書こう：

$$\dot{\Phi}_i = \frac{1}{T} \sum_{j \neq i} J_{ij}(\Phi_i - \Phi_j). \quad (22)$$

例として、円軌道 (9) (ただし $b \ll d$) と駆動力 (12) (ただし $A \ll 1$) の組み合わせに対しては、 b/d の0次、 A の1次までの近似で

$$J_{ij}(\Phi_i - \Phi_j) \simeq \frac{\gamma}{2|i-j|^3} [\cos(\Phi_i - \Phi_j) - A \sin(\Phi_i - \Phi_j)]. \quad (23)$$

となる。いま進行波解を求めるため、回転子のインデックス i, j をそれらの位置 x, x' によって置き換えて (22), (23) を

$$\dot{\Phi}(x) = - \sum_{x' \neq x} K(x - x') \sin[\Phi(x) - \Phi(x') - \Delta(x - x')] \quad (24)$$

の形に書き直す。ここで相互作用カーネル $K(x)$ と位相遅れ $\Delta(x)$ は

$$K(x) \sin \Delta(x) = \frac{\gamma d^3}{2|x|^3}, \quad K(x) \cos \Delta(x) = -\frac{\gamma d^3 A}{2|x|^3} \quad (25)$$

を満たす。波数 k , 周波数 Ω の進行波解

$$\Phi_{k,\Omega}(x, t) = kx - \Omega t \quad (26)$$

を仮定して (24) に代入すると、分散関係

$$\Omega = K_s(k) \equiv \sum_x K(x) \sin \Delta(x) \exp(-ikx) \quad (27)$$

を得る。この解の安定性を調べるため $\Phi(x, t) = \Phi_{k,\Omega}(x, t) + \delta\Phi(x, t)$ とおいて (24) に代入し、摂動 $\delta\Phi$ について線形化すると、Fourier 成分

$$\delta\Phi(q, t) = \sum_x \delta\Phi(x, t) \exp(-iqx) \quad (28)$$

に対して

$$\dot{\delta\Phi}(q, t) = \Gamma(q, k) \delta\Phi(q, t), \quad (29)$$

$$\Gamma(q, k) = \frac{1}{2} [K_c(k+q) + K_c(k-q) - 2K_c(k)] \quad (30)$$

$$K_c(k) = \sum_x K(x) \cos \Delta(x) \exp(-ikx) \quad (31)$$

を得る。進行波解 (26) が安定であるためには全ての波数 q に対して $\Gamma(q, k) < 0$ となることが必要である。これは $\pi/2 < kd < 3\pi/2$ の場合に満たされることが分かった。

6 考察と結論

本稿では周期的駆動力を持つ回転子のモデルを用いて、流体力学相互作用による同期現象を解析した。一般的な軌道形状や駆動力プロファイルについて2個の回転子が同期するための必要十分条件が示された。1自由度の回転子でも同期を示すことから、鞭毛や繊毛の柔軟性は同期現象において必ずしも重要ではないことが示された。

回転子の1次元格子における進行波については、本稿で取り上げた例では進行方向は一意的に選択されない。また2次元進行波解は不安定となることが示せる。ゾウリムシの場合、繊毛は2次元的に配列しており、メタクロナル波の進行方向は有効打の方向と逆 (antiplectic) であることが知られている。これらの特徴を説明するには軌道形状や駆動力プロファイルに改良を加え、近接効果などを取り入れた更なる解析が必要である。

現実の鞭毛や繊毛は非常に複雑な系であり、ミニマルモデルでその特徴を全てとらえることは困難であるが、より単純な実験系を構築して理論を検証することは可能である。たとえば光渦によって円軌道上を駆動されるコロイド [17] において光渦のパターンを調節することにより、駆動力を周期的に変動させることが可能であろう。これは本稿で述べたモデルと直接的に対応するものであり、今後の実験的検証が望まれる。

謝辞

本稿の内容は Ramin Golestanian 氏との共同研究によっています。この研究は日本学術振興会科学研究費補助金「アクティブ流動系における同期現象と協同的ダイナミクスの理論」および同先端研究拠点事業「ソフトマターの非平衡ダイナミクスに関する国際研究ネットワーク」による援助を受けています。最後になりますが、発表の機会を与えて頂いた飯間信先生に感謝いたします。

参考文献

- [1] E. M. Purcell, Am. J. Phys. **45**, 3 (1977).
- [2] D. Bray, "Cell Movements: From Molecules to Motility" (2nd Edition), Garland Publishing, New York (2000).
- [3] M. Polin *et al.*, Science **325**, 487 (2009); R. E. Goldstein, M. Polin, and I. Tuval, Phys. Rev. Lett. **103**, 168103 (2009).
- [4] G. I. Taylor, Proc. R. Soc. A **209**, 447 (1951); G. J. Elfring and E. Lauga, Phys. Rev. Lett. **103**, 088101 (2009).
- [5] S. Gueron and K. Levit-Gurevich, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **96**, 12240 (1999).
- [6] Y. W. Kim and R. R. Netz, Phys. Rev. Lett. **96**, 158101 (2006).
- [7] B. Guirao and J.-F. Joanny, Biophys. J. **92**, 1900 (2007).
- [8] Y. Yang, J. Elgeti and G. Gompper, Phys. Rev. E **78**, 061903 (2008).
- [9] M. Kim and T.R. Powers, Phys. Rev. E **69**, 061910 (2004).
- [10] A. Ryskin and P. Lenz, Phys. Biol. **3**, 285 (2006).
- [11] M. Reichert and H. Stark, Eur. Phys. J. E **17**, 493 (2005).
- [12] T. Niedermayer, B. Eckhardt, and P. Lenz, Chaos **18**, 037128 (2008).
- [13] N. Uchida and R. Golestanian, Phys. Rev. Lett. **106**, 058104 (2011).

- [14] N. Uchida and R. Golestanian, Phys. Rev. Lett. **104**, 178103 (2010).
- [15] 内田就也, 数理解析研究所講究録 **1742**, 42 (2011).
- [16] R. Golestanian, J. M. Yeomans and N. Uchida, Soft Matter **7**, 3074 (2011).
- [17] D. G. Grier, Nature **424**, 21 (2003).